

XV. Fijación biológica de nitrógeno

Introducción

El metabolismo de los compuestos nitrogenados comprende a un gran conjunto de reacciones donde están involucradas las pequeñas moléculas que contienen nitrógeno, entre ellas los aminoácidos, las bases nitrogenadas y la mayoría de las coenzimas. Su metabolismo puede ser analizado desde dos aspectos, el primero involucra el origen y el destino de los átomos de nitrógeno de estas moléculas (lo que las hace particulares dentro de la diversidad de pequeñas moléculas celulares), mientras que el segundo involucra el origen y el destino de los esqueletos de átomos de carbono de las mismas (lo que las relaciona con el resto de las pequeñas moléculas celulares).

En el caso del nitrógeno, al igual que en el ciclo del carbono, encontramos una interdependencia metabólica y nutritiva entre los diferentes tipos de organismos. Aunque el nitrógeno molecular (N_2) se halla en gran cantidad en la atmósfera, es relativamente inerte desde el punto de vista químico y no puede ser utilizado por la mayor parte de las formas vivas. La gran mayoría de los organismos vivos obtienen su nitrógeno de alguna forma combinada; por ejemplo, nitrato, amoníaco o compuestos más complejos como los aminoácidos. Sin embargo, tales formas combinadas de nitrógeno son muy escasas en las aguas superficiales y en el suelo, y experimentan un recambio continuo. La mayor parte de los vegetales obtienen su nitrógeno del suelo en forma de nitrato, al que reducen para formar amoníaco, aminoácidos y otros productos reducidos. Todos estos productos son elaborados para formar los componentes nitrogenados de la célula, tales como las proteínas.

Los organismos heterótrofos utilizan, a continuación, las proteínas de las plantas como elementos nutritivos y devuelven el nitrógeno al suelo en forma de productos finales de excreción o como productos de la putrefacción después de su muerte, generalmente en forma de amoníaco. Los microorganismos del suelo, a su vez, oxidan el amoníaco para formar nitrito y nitrato, que pueden ser utilizados de nuevo por los vegetales. Solamente unas pocas formas de vida, tales como las bacterias fijadoras de nitrógeno, pueden reducir el nitrógeno atmosférico y suplementar de este modo el suministro biológicamente disponible de nitrógeno combinado de la biosfera.

Las células más autosuficientes que se conocen son las cianobacterias (fotosintéticas, fijadoras de nitrógeno), que son procariotas que se encuentran en el suelo, en el agua corriente y en los océanos. Estos organismos obtienen su energía de la luz solar, su carbono del dióxido de carbono, y el nitrógeno procede del nitrógeno atmosférico; los electrones para la reducción del dióxido de carbono proceden del agua.

En prácticamente la totalidad de estos compuestos el nitrógeno se encuentra en el estado de oxidación que corresponde al amonio. Sin embargo, la fuente principal de todo el nitrógeno orgánico es el relativamente inerte gas N_2 , que constituye aproximadamente el 70% del aire en la atmósfera terrestre.

No todos los seres vivos son capaces de sintetizar todos los compuestos nitrogenados que requieren para su desarrollo. Por lo mismo, en caso de no poseer esa capacidad de síntesis, deben obtenerlo de su alimentación. Estos compuestos, que son requerimientos absolutos en la dieta de un determinado organismo para su desarrollo son denominados compuestos esenciales.

Casi todos los organismos tienen la capacidad de sintetizar sus bases nitrogenadas, pocos pueden sintetizar los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas, menos aún son los capaces de sintetizar las coenzimas o vitaminas que son requeridas para el crecimiento y el desarrollo de cualquier otra forma de vida. Todavía son menos los organismos en la tierra que son capaces de realizar la fijación biológica del nitrógeno, el proceso del cual dependen, casi exclusivamente, todos los demás. En principio, este proceso implica la conversión del gas N_2 en amonio, el cual termina siendo incorporado directamente en las moléculas orgánicas como veremos más adelante.

Otras fuentes de nitrógeno orgánico que pueden ser utilizadas por las plantas y algunos microorganismos para convertirlo en NH_4^+ , es el NO_3^- o el NO_2^- que se encuentran en los suelos. De esta manera las plantas requieren siempre del nitrógeno aportado por otros organismos, ya sea en la forma de NH_4^+ obtenido por fijación o por descomposición de tejidos, o el NO_3^- o NO_2^- que se producen fundamentalmente por oxidación biológica por microorganismos de vida libre en los suelos. En cambio los vertebrados obtienen su nitrógeno orgánico a partir de su alimentación con tejidos animales, vegetales, con hongos o con microorganismos.

Organismos fijadores de nitrógeno

La fijación del nitrógeno molecular del aire, esto es, su reducción a amoníaco y su transformación a otras formas nitrogenadas útiles para una célula como aminoácidos, constituye un proceso de la mayor importancia en la biosfera. Sin embargo, puede ser llevado a cabo solamente por un limitado número de microorganismos. La mayoría de las leguminosas pueden fijar al N_2 atmosférico, lo mismo que unas 250 o más especies de plantas no leguminosas, llamadas actinorrícicas. La fijación de nitrógeno por las leguminosas requiere la cooperación de la planta huésped con bacterias presentes en sus nódulos radiculares. Por ello se la denomina fijación simbiótica del nitrógeno. Algunas de las plantas fijadoras de nitrógeno son las legumbres (poroto, arveja, trébol, alfalfa, soja), o el Aliso (un árbol nativo del noroeste argentino), las casuarinas (introducidas en todo el país desde Australia) y los chacayales (en la Patagonia) entre las no leguminosas. Enormes cantidades de nitrógeno resultan fijadas por estas plantas.

Los microorganismos que invaden las raíces de las leguminosas son, principalmente, especies del género bacteriano rhizobium, mientras que las del género frankia viven en una simbiosis similar con árboles y arbustos actinorrícicos del tipo del Aliso.

Estas bacterias infecciosas se abren camino en el parénquima cortical de la raíz provocando la formación de un nódulo, estructura altamente organizada que contiene células corticales repletas de formas altamente diferenciadas de la bacteria para la fijación de nitrógeno. El nódulo está en conexión directa con el sistema vascular de la planta.

Las plantas leguminosas carentes de tales bacterias no pueden fijar nitrógeno. Sin embargo, las bacterias extraídas de los nódulos de la planta anfitriona pueden hacerlo si el cultivo no posee una fuente de nitrógeno mineral u orgánico, pero ha sido adecuadamente fortificado. En cambio estas células no fijan nitrógeno si se desarrollan en un medio de cultivo normal. De manera que las enzimas fijadoras de nitrógeno sólo son expresadas por las bacterias en las condiciones que la planta le proporciona dentro del nódulo radicular.

Una fijación no simbiótica de nitrógeno tiene efecto en un determinado número de microorganismos de vida libre, entre los que se incluye a las cianobacterias, a la bacteria aeróbica del suelo *Azotobacter* y a las bacterias facultativas *Klebsiella* y *Achromobacter*. Entre los microorganismos anaerobios, hay varias especies de *Clostridium* especialmente activas en la fijación de nitrógeno. En general, todas las bacterias fotosintéticas también son capaces de fijar nitrógeno.

Ciclo del Nitrógeno en la biosfera.

1. Fijación del Nitrógeno. Hay dos procesos que contribuyen a la conversión del N_2 en NH_4^+ . Uno de ellos es un proceso industrial diseñado por Haber-Bosch, que se utiliza para generar el fertilizante de mayor uso en la agricultura. Por este proceso el N_2 es convertido en NH_4^+ , utilizando H_2 como reductor a altas presiones y temperaturas y en presencia de catalizadores químicos. Una cantidad similar de NH_4^+ ($\sim 10^8$ toneladas/año) es producida por fijación biológica. Los organismos que tienen esta capacidad son un conjunto de bacterias y algas que pueden sintetizar una enzima muy compleja llamada nitrogenasa. Esta enzima utiliza el poder reductor provisto por equivalentes de ferredoxina, alguna otra flavoproteína, u otros donadores, hacia el N_2 para producir NH_4^+ , mediante un proceso en el que también dos equivalentes de H^+ son reducidos a H_2 .

La nitrogenasa está presente tanto en las bacterias simbióticas del género *Rhizobium* o *Frankia* como en bacterias de vida libre (*Azotobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium*, que se encuentran en los suelos, y las *Cianobacterias* encontradas en ambientes acuáticos).

2. Mecanismo enzimático de la fijación biológica del nitrógeno. El mecanismo de la fijación del nitrógeno, ha constituido desde hace tiempo un difícil problema bioquímico. Dado que el nitrógeno molecular es una molécula sumamente estable, que no puede ser reducida químicamente con facilidad, por mucho tiempo resultó difícil de imaginar cómo una molécula tan inerte pueda ligarse de manera fuerte y específica al centro activo del complejo enzimático fijador de nitrógeno.

El **KM** para el nitrógeno en el proceso de fijación de los nódulos de la soja o de las cianobacterias, es de tan sólo de 0,02 atm de nitrógeno aproximadamente. Por lo mismo, el sistema fijador de nitrógeno está completamente saturado a la presión parcial normal del nitrógeno en el aire ($\sim 0,8$ atm).

Algunos estudios demostraron que, además del nitrógeno, podían reducirse otros compuestos que contenían triples enlaces, tales como el acetileno ($CH \equiv CH$), el cianuro ($H-C \equiv N$) y la azida (N_3H). De hecho, la reducción del acetileno a etileno ($CH_2=CH_2$) es una reacción útil para medir la actividad fijadora de nitrógeno, puesto que tanto el acetileno (sustrato) como el etileno (producto) pueden separarse y determinarse cuantitativamente por cromatografía de gases.

Otras observaciones estaban relacionadas con la identificación de los donadores de electrones o de hidrógeno utilizados para la reducción del nitrógeno molecular a amoníaco. Muchos organismos fijadores de nitrógeno pueden utilizar el hidrógeno con tal finalidad. Sin embargo, otros reductores

como por ejemplo el piruvato o el formiato, pueden también proporcionar electrones o hidrógeno para la reducción del nitrógeno a amoníaco.

En 1960, L. E. Mortenson y colaboradores consiguieron finalmente obtener, en forma reproducible, extractos exentos de células de la bacteria anaerobia *Clostridium pasteurianum* que podían fijar nitrógeno previo agregado de un dador de electrones adecuado y de ATP: El complejo enzimático presente en estos extractos se denominó nitrogenasa. El primer producto estable de la reacción de fijación es el amoníaco, y un coproducto de la misma es el hidrógeno molecular. El sistema de esta y de otras bacterias fijadoras de nitrógeno resultó ser extraordinariamente sensible al oxígeno molecular, que lo inactiva. Por lo tanto, era necesario preparar y purificar el sistema en un ambiente exento de oxígeno.

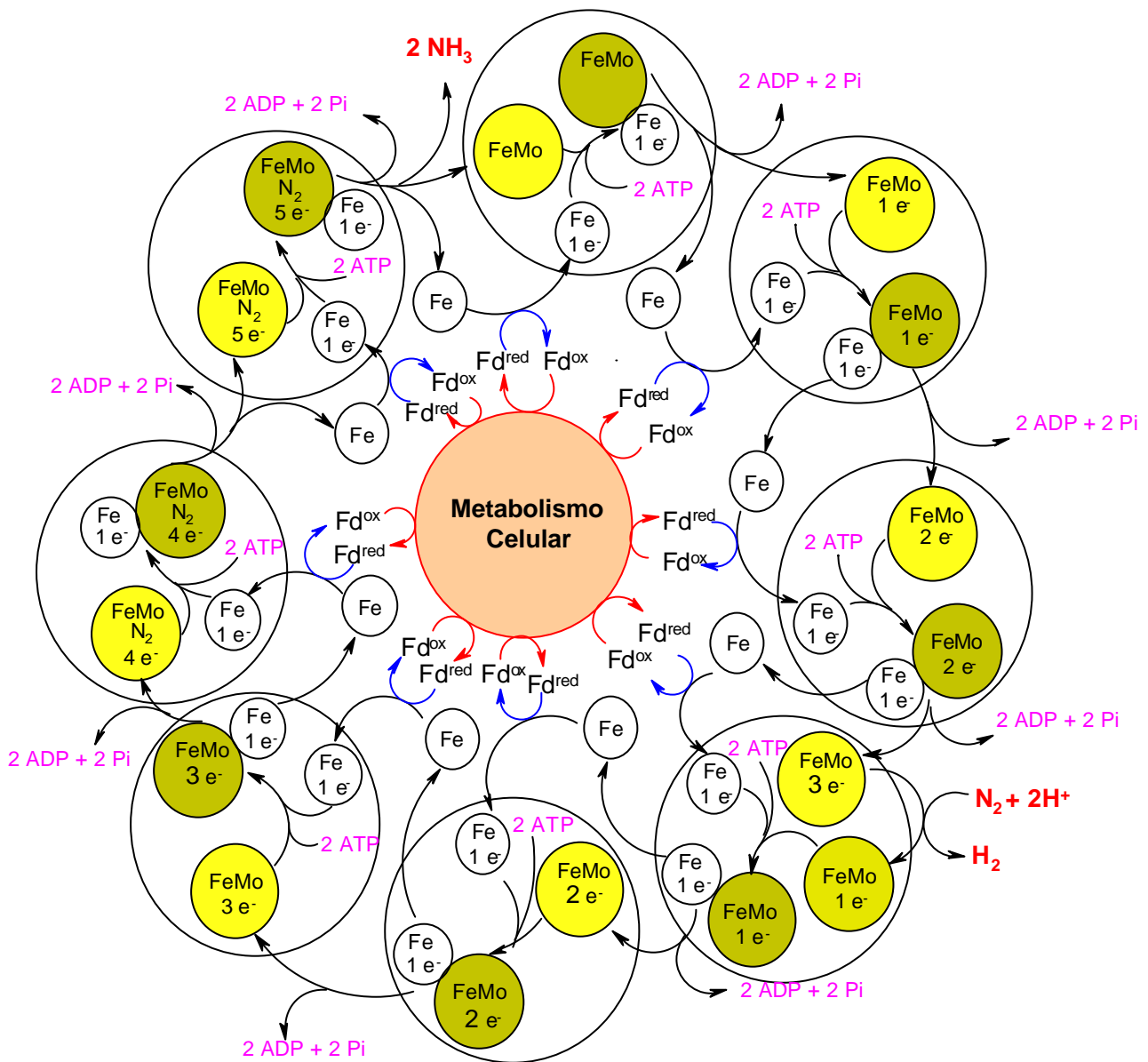
En 1964 otros investigadores aislaron una proteína de los extractos de *C. pasteurianum*, y demostraron que era esencial para la fijación del nitrógeno. Esta proteína, que funcionaba como transportador de electrones hacia la nitrogenasa, contenía siete átomos de hierro y otros siete de azufre ácido-lábil, pero no contenía hemo. A esta proteína la denominaron *Ferredoxina* (derivada de hierro y redox); fue la primera de muchas proteínas con hierro y azufre que después se aislaron de fuentes naturales. Como vimos, otras proteínas similares intervienen en el transporte electrónico mitocondrial y en el fotosintético. La ferredoxina del *C. pasteurianum* posee un potencial de oxidorreducción estándar muy negativo, (-0,43 V). La ferredoxina reducida actúa como donador de electrones en el sistema de la nitrogenasa del *C. pasteurianum*. Otras bacterias fijadoras de nitrógeno contienen Flavodoxina, una proteína con un funcionamiento similar a la ferredoxina; pero que contiene FMN, en lugar de hierro.

La nitrogenasa es un complejo de dos proteínas, cada una de ellas una metaloproteína. Aisladamente, ninguna de las proteínas, exhibe alguna actividad observable. Una de ellas es una proteína que contiene molibdeno, hierro y azufre (simbolizada por Mo-Fe-proteína). Esta proteína, que contiene dos clases de subunidades, se ha obtenido en forma cristalizada. Posee 2 átomos de molibdeno, 32 de hierro y de 25 a 30 de azufre ácido-lábil. El otro componente es una proteína con hierro (Fe-proteína). Ambos componentes se encuentran presentes en la relación de una Mo-Fe-proteína por cada dos Fe-proteína.

En la hipótesis más aceptada del mecanismo de la fijación de nitrógeno, la ferredoxina reducida actúa de dador electrónico inmediato, reduciendo una molécula de N_2 a dos de NH_3 . Para ello, hacen falta seis electrones. Sin embargo conjuntamente con la producción de una molécula de NH_3 se produce la reducción de $2H^+$ a H_2 molecular, por lo que en total se utilizan 8 electrones por cada N_2 fijado en la nitrogenasa. Además, por cada electrón transferido se consumen dos moléculas de ATP. Por lo tanto, la reacción global es la siguiente:



La regeneración de la ferredoxina reducida es el producto del metabolismo celular y tiene efecto por medio de un sistema de piruvato-deshidrogenasa ligada a ferredoxina o gracias a la enzima NADH-ferredoxina-oxido-reductasa: $NADH + Fd^{oxidada} \rightarrow NAD^+ + Fd^{reducida} + H^+$



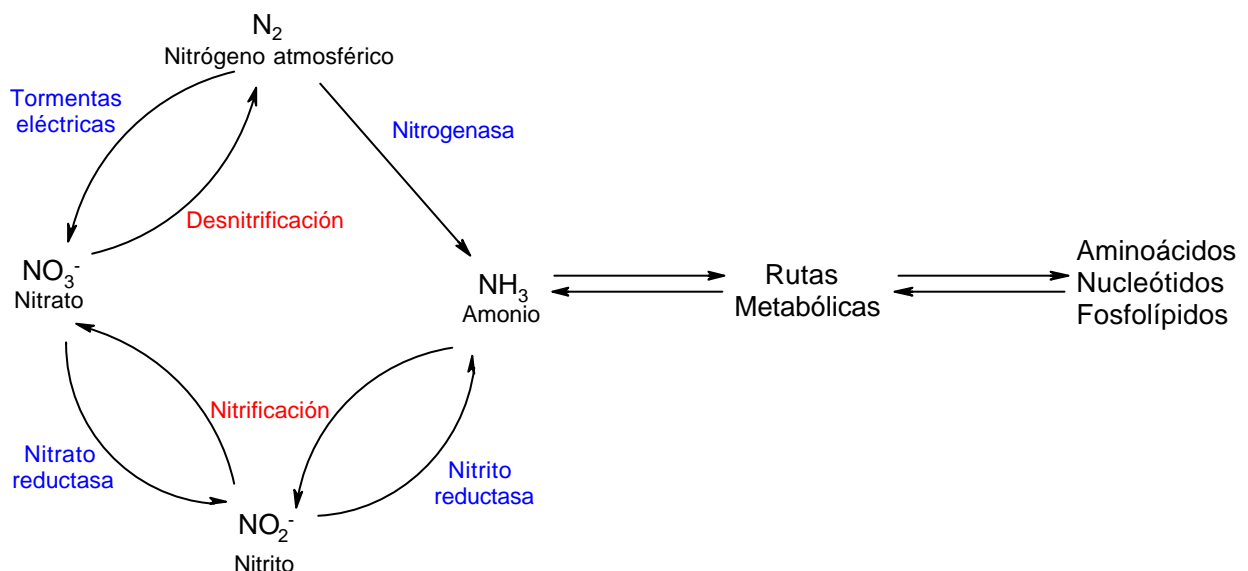
Ambas metaloproteínas son altamente susceptibles a la inactivación por el O₂, por lo que todos los organismos fijadores de nitrógeno desarrollan mecanismos de protección contra la oxidación de sus nitrogenasas. En muchas bacterias, en condiciones de fijación de nitrógeno activa se produce un aumento de la velocidad de transporte electrónico de manera que la concentración de O₂ disminuye debido a su transformación en H₂O. Otras bacterias sintetizan proteínas que recubren a la nitrogenasa y que actúan de la misma manera que las capas de antioxidantes que se colocan sobre los metales para evitar su degradación.

Un tercer mecanismo es el que se desarrolló en los nódulos radiculares de las leguminosas infectados por los rizobios. En esta simbiosis, la planta es beneficiada por el aumento de la concentración de NH₄⁺. De esta manera la planta tiene en su interior una alta concentración del sustrato inicial para la biosíntesis de elementos nitrogenados sólo cuando el rizobio está ocupando su lugar en el nódulo radicular. Por otra parte el rizobio se beneficia por poseer un

medio externo controlado y con nutrientes suficientes para su desarrollo. En este medio, la actividad de la nitrogenasa del rizobio es fundamental para el mantenimiento de la simbiosis.

Por ello, una vez en contacto con la bacteria, la planta comienza a sintetizar una proteína, que vuelca en el líquido del nódulo que recubre a las bacterias. Esta proteína denominada leg-hemoglobina, tiene una alta afinidad por el O_2 muy elevada. La leg-hemoglobina es un análogo a la hemoglobina de los vertebrados. Esta proteína, que no se encuentra en ninguna otra localización en el reino vegetal, ayuda a la fijación del nitrógeno de un modo indirecto. Al captar O_2 elimina la capacidad de inhibición de la fijación de nitrógeno. La información genética para la biosíntesis de la hemoglobina nodular procede de la planta, pero el pigmento no se forma en ausencia de bacterias.

3. Otras etapas del ciclo del nitrógeno. Aunque el nitrógeno reducido, ya sea como amoníaco o como aminoácidos, es la forma cómo es utilizado por la mayoría de los organismos vivos, algunas bacterias del suelo consiguen su energía oxidando el amoníaco con formación de nitrito, y a partir de él, nitrato. Debido a la enorme abundancia de estos organismos y a su gran actividad,



casi todo el amoníaco que llega al suelo resulta rápidamente oxidado a nitrato en un proceso que se denomina *nitrificación*.

La nitrificación se realiza en dos etapas. En la primera, el amoníaco es oxidado a nitrito de forma casi exclusiva por la bacteria aeróbica quimiolitotrófica *Nitrosomonas*. Para este microorganismo, el amoníaco desempeña el papel de combustible aportador de energía, ya que constituye el principal dador de electrones en la respiración de la Nitrosomona. Los electrones fluyen desde el sistema primario de la amonio-deshidrogenasa hasta el oxígeno, pasando a lo largo de una cadena de transporte que contiene citocromos. Como en otros organismos, acoplado a este transporte electrónico funciona la fosforilación oxidativa.

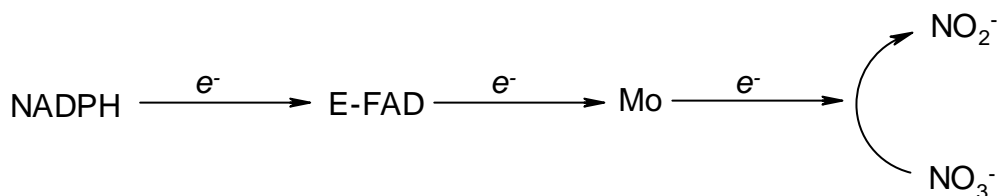
Después, el nitrito es oxidado a nitrato, de un modo similar, por el *Nitrobacter*. Esta bacteria obtiene su energía casi exclusivamente a partir de la oxidación del nitrito. Tanto los *Nitrosomonas* como los *Nitrobacter* obtienen del CO_2 el carbono que necesitan para su crecimiento.

Por otra parte, el nitrato es la principal forma de nitrógeno asequible a las plantas superiores procedente del suelo.

Algo de nitrato se produce a partir del N_2 por medio de la oxidación natural en la atmósfera catalizada por los radicales libres generados en las tormentas eléctricas. Junto con esto, algo de nitrato se pierde del suelo en forma de nitrógeno molecular, por la acción de unas bacterias que emplean al nitrato como aceptor electrónico final en un proceso denominado *desnitrificación*. Sin embargo, una gran cantidad de nitrato es absorbida del suelo por las plantas superiores, cuya asimilación metabólica en forma de amoníaco se produce en dos etapas principales:

1) reducción del nitrato a nitrito y 2) reducción del nitrito a amoníaco.

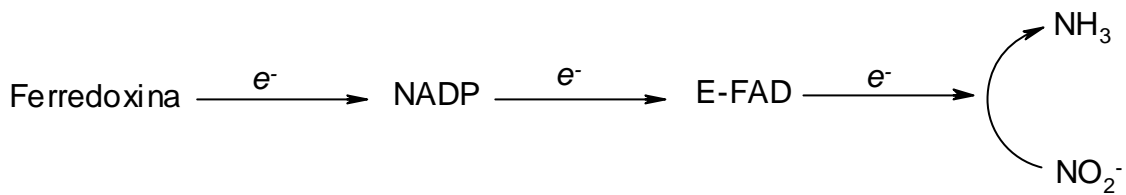
La primera reacción de la utilización del nitrato es catalizada por la *nitratoreductasa*, que está ampliamente distribuida en las plantas y en los hongos. Esta enzima ha sido estudiada en el hongo *Neurospora crassa*, es una flavoproteína que contiene molibdeno y citocromo *b*, y utiliza al NADPH como donador electrónico. El proceso global del flujo electrónico hacia el nitrato puede resumirse con el siguiente esquema



El molibdeno experimenta cambios cíclicos de valencia entre Mo(V) y Mo(VI) durante la reducción del nitrato.

Ciertos organismos pueden también utilizar al nitrato como aceptor electrónico final en vez del oxígeno, generalmente cuando se encuentran en condiciones total o parcialmente anaeróbicas. Debido a la semejanza fisiológica y enzimológica de este proceso con la respiración aeróbica, se lo denomina *nitrito-respiración*. La nitrato-reductasa respiratoria, que ha sido ampliamente estudiada en *E. coli*, utiliza al formiato como donador de electrones y emplea al citocromo *b*, al molibdeno y al hierro (no hemo) como componentes. Igual que antes, este transporte está asociado a la translocación de H^+ y la formación concomitante de ATP a partir de ADP y fosfato.

La reducción del nitrito a amoníaco por la *nitrito-reductasa* de las plantas requiere un reductor muy fuerte (ΔE altamente electronegativo). Por ello, en las plantas verdes, la ferredoxina, reducida durante las reacciones luminosas de la fotosíntesis, puede servir como reductor del nitrito según la siguiente cadena de reacciones:



La reducción del nitrito a amoníaco requiere la incorporación de seis electrones. Recuérdese que la respiración, la cual requiere cuatro electrones para reducir una molécula de O_2 , y la fijación de nitrógeno, que necesita seis por molécula de N_2 , constituyen otros ejemplos de reducciones multielectrónicas cuyos mecanismos de reacción son verdaderos rompecabezas. Tanto la nitrito-reductasa como la sulfito-reductasa, que también cataliza la transferencia de seis electrones, contienen un grupo prostético especial denominado sirohemo, que es una porfirina con un Fe central (como en los citocromos) pero en la que dos de los anillos pirrólicos están en forma reducida.

El amoníaco libre, que es el producto final de la reducción del nitrato, es entonces utilizado para aminorar al α -oxoglutarato, proporcionando así grupos amino para las transaminaciones.